

動植物体組織中のアミノ態窒素の微量定量 (予報)

林 義 男

The Microdetermination of Amino N in Natural Sources.

YOSHIO HAYASHI

アミノ態窒素の定量法のうち、比較的微量で簡単迅速に行いうる方法として Kober¹⁾ の創案した加銅法がある。Pope 等²⁾ は是を改良して、磷酸銅懸濁液を用い、溶液状態のアミノ酸銅塩を沃度法で測定するようにした。

この方法は、単なるアミノ酸溶液に就ては簡単正確に用い得られるが、自然物中の他の成分その他の条件の如何により、例えば生物体液中のアミノ酸が正確に測定し得るものであるかどうか明確にするため本実験を開始した。

実 験

I. 試 薬

1. 塩化銅 CuCl_2 27.3 g. を 1L の水に溶解す。
2. 磷酸ソーダ Na_2HPO_4 64.5 g. を 500 c.c. の水に溶解し、NaOH 7.2 g. を加え溶解混合した後水を加えて 1L. とする。
3. 硼酸緩衝液 硼酸ソーダ 57.21 g. を水 1.5L に溶解し、N-HCl 100 c.c. を加え混合した後、水を追加して 2L. とする。
4. 磷酸銅懸濁液 試薬 1 の 1 部と 2 の 2 部とをよく混合し、3 の 2 部を加えてよく混じる。
5. チモールフタレイン 0.25 g を 50% 酒精 100 c.c に溶解する。
6. チオ硫酸ソーダ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 49.6 g を水に溶解し、0.1% 硼酸ソーダ溶液約 50 c.c を加え、更に水にて 2L. に充し貯蔵液とする。使用に際し 0.1% 硼酸ソーダ溶液にて 0.005 N (20倍

稀釈) 溶液を作り使用する。

7. 澱粉溶液 馬鈴薯澱粉 10 g を水約 50c.c と混合し、これを湯浴上で加熱しながら、1L. の沸騰水を加え、更に N-NaOH 100c.c を加えて溶液が透明になる迄加熱攪拌する。後冷却し、N-HCl にて中和し PH 7 にする。活性炭を加えて脱色濾過し、無色透明液を得る。更にこれに食塩を飽和せしめる。

操 作

アミノ酸溶液 5 c.c を 50 c.c の三角フラスコにとり、チモールフタレイン 4 滴を加え N-NaOH を弱い青色となる迄加える。これに磷酸銅懸濁液 25 c.c を加えてよく混合する。蒸溜水を用いて、混合液を 50 c.c のメスフラスコに移し、劃線まで充す。遠心沈澱器を使用して上澄液を得、尚微細な磷酸銅を除くために定量濾紙にて濾過する。濾液 5 c.c を小型三角フラスコにとり、醋酸 (5:1) 1 c.c を加え、KI 0.5 g を加えて遊離した沃度を 0.005 N- チオ硫酸ソーダ溶液で滴定する。終点に近づけば、澱粉液 4 滴を加え、滴定を完了する。

又対照として、水 5 cc. について同様に実施し、上の結果を補正する。

結 果

- I 磷酸銅懸濁液の調製割合を変じた場合。
- 試薬 No. 1: 2: 3 = 1: 3: 2 A
- 試薬 No. 1: 2: 3 = 1: 2: 2 B

アミノ酸溶液としてグルタミン酸(GA)0.01gN/100 c.c.
の溶液を用いた

5 cc. G.A.+A 25 cc. ……S₁

5 cc. G.A.+B 25 cc. ……S₂

5 cc. 水 +A 25 cc. ……T₁

5 cc. 水 +B 25 cc. ……T₂

0.005 N-チオ硫酸ソーダの滴定値 (4 回平均)

T₁ 0.040 cc.

T₂ 0.041 cc.

S₁ 0.379 cc.

S₂ 0.382 cc.

故に S₁-T₁=0.339 cc.

S₂-T₂=0.341 cc.

所で滴定用供試液 5 cc.=0.05 mg N であるから、この場合 0.005 N-チオ硫酸ソーダ 1 cc. は

S₁ 147.4 γ NH₂-N

S₂ 146.6 γ NH₂-N に夫々相応する。

この結果、磷酸銅の2種の調製法による差異は僅少である。従つて以下の実験に於ては B の調製割合の懸濁液を使用することとする。但し対照(水)は毎時施行すべきであり、已知濃度のアミノ酸溶液についても同時に実施すべきであると考えられる。

II PH の影響

チモールフタレインとアルカリの添加により生じる検液の青色は検液の種類に依り不明確で、アルカリの添加量が過剰になり易い。依つて適当に稀めたペプトン加水分解液 5 cc. について、次のような PH におけ滴定値を比較してみた。

PH 8.8 (S₁) 9.2 以上 (S₂) 7.0 (S₃)
4.7 (S₄)

前述の通り操作し、0.005 N-チオ硫酸ソーダによる滴定値は夫々

S₁ 0.534 cc. S₂ 0.534 c.c S₃ 0.501 cc. S₄ 0.507 cc.

であった。従つて PH 8~9 又はそれ以上のアルカリ性に於て呈する弱青色の状態にて操作した方が安定な結果が得られることが判る。

III アミノ酸溶液の検定と実験誤差

前記 II の実験より得た 0.005 N-チオ硫酸ソーダ 1 cc. =146.6 γ N をそのまま利用し、新たに調製したグルタミン酸溶液 (0.1 mg N/cc.) を検定した。その結果、滴定平均値 0.350 cc. (対照値 0.040 cc. を減じた値) を得、従つて 146.6 γ × 0.350 × 10 = 513.1 γ N となる。よつて実験誤差は 2.6% となる。

要 約

1. 磷酸銅懸濁液の調製割合は、試薬 No. 1, 2, 3 を 1:2:2, 1:3:2 の二種として比較したが、結果は僅少の差であつて、文献の通り 1:2:2 を採用し、実施の都度、新調した。
2. 対照の滴定は必ず行うべきである。
3. PH は 8~9 或いはそれを超過しても結果に変化がないと思われる。
4. 同じチオ硫酸ソーダ溶液を用い、新調したグルタミン酸溶液を検定した結果の誤差は 2.6% であつた。

文 献

1. KOBER, SUGIURA: J. Biol. Chem., **13**, 1 (1912)
2. POPE, STEVENS: Biochem. J., **33**, 1070 (1939)
(1954年12月受理)